



УТВЕРЖДАЮ

Директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесетского»

А.А.Гусев

» мая 2011 г.

ОТЧЕТ

по заданию: «Определить действие биоцидного средства для дезинфекции Любисан-Эко на возбудители туберкулеза бычьего, человеческого вида и атипичные (нетуберкулезные) микобактерии»

Срок выполнения март-май 2011 г.

Ответственный исполнитель: зав. отделом зоонозов и разработки диагностических препаратов профессор, доктор ветеринарных наук

А.П. Лысенко

Введение

Интенсификация производства продуктов животноводства сопряжена со значительной концентрацией высокопродуктивных животных на ограниченных площадях, что сопровождается резким ростом числа микроорганизмов в среде обитания животных, усилением их патогенности и устойчивости к дезинфицирующим средствам [В.А. Атамась, 2004, В.А. Аржаков, 2006]. В связи с этим, немаловажным фактором, сдерживающим рост продуктивности животноводства, является риск возникновения инфекционных болезней, не только социально значимых, но и обусловленных условно-патогенной микрофлорой, превалирующей в современной этиологической структуре заболеваемости [А.И. Завгородний, 2004].

В мероприятиях по предупреждению инфекционных заболеваний важная роль отводится специфической профилактике. Однако вакцинация влияет только на одно звено эпизоотической цепи – организм животного и не затрагивает резервуары инфекции и факторы передачи.

Сложилось представление о том, что для обеспечения стабильного ветеринарного благополучия животноводства и охраны здоровья населения требуется использование комплекса средств и методов разрыва эпизоотической цепи путем регулярной санации и дезинфекции среды обитания продуктивных животных [И.Я. Котюмбас, 2007].

Практика ведения промышленного животноводства показывает, что эффективность традиционных средств, длительно применявшихся для дезинфекции, заметно снизилась, а большинство из них представляют угрозу

здоровью животных и состоянию внешней среды [А.М. Смирнов, 2006, А.Э.Высоцкий, 2009]. Альтернативой «формальдегидной» и «каустической» дезинфекции должны стать новые малоопасные дезинфектанты.

Значительной проблемой является выбор способа дезинфекции. В современных условиях ведения животноводства трудно обеспечить качественную механическую очистку, которая должна предшествовать применению любого дезинфектанта в виде раствора. Наличие на поверхностях органических веществ резко снижает активность дезинфектантов, особенно, с механизмом действия, направленным на коагуляцию белка. Кроме того, сложно обеспечить продолжительный контакт дезинфектанта с поверхностями, особенно в зимний период. Проведение дезинфекции методом полива – трудоемкое мероприятие, требующее наличия специальной техники и подготовленного персонала. Такая дезинфекция проводится не чаще 1 раза в месяц, хотя в этот промежуток, источники инфекции могут контаминировать поверхности и заразить здоровых животных.

В этой связи использование сухих, сыпучих дезинфектантов с адсорбирующими свойствами типа «Любисан Эко» представляет исключительный интерес, в первую очередь для профилактики туберкулеза и возникновения неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота, вызываемых нетуберкулезными микобактериями.

Цель работы: выяснить действие Любисана Эко на возбудители туберкулеза бычьего, человеческого вида и атипичные (нетуберкулезные) микобактерии

Задачи исследований

1. Выяснить действие Любисана Эко на возбудители туберкулеза бычьего, человеческого вида и атипичные (нетуберкулезные) микобактерии, находящиеся на поверхности тест-объектов.

2. Выяснить жизнеспособность возбудителей туберкулеза бычьего, человеческого вида и атипичных (нетуберкулезных) микобактерий, при их нанесении на слой Любисана Эко.

Материал, методы и объем исследований

В исследованиях использовали Любисан Эко (ОДО «Группа ЛДФ», серии 02, изготовлен 15.02.2011г.).

Штаммы микобактерий. Для выполнения исследований использовали штаммы *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* (институт Пастера, Париж), *M.bovis* 8 (ВГНКИ ветпрепаратов), *M.fortuitum* 342 (ЦНИИТ) из коллекции культур КМИЭВ, выращенные на среде Левенштейна-Иенсена.

Культуры снимались с поверхности питательной среды Левенштейна-Иенсена, гомогенизировались в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия. Крупные агломераты осаждали центрифугированием взвеси при 600 об/мин.

Концентрацию гомогенной взвеси культур доводили до оптической плотности 0,2 при 640 нм.

Для решения 1 задачи приготовили тест-объекты (по 3 на каждый вид микобактерий) из фрагментов кирпича (1x2 см), которые предварительно стерилизовали при 121⁰С в течение 30 мин. На тест объекты наносили 0,5 мл суспензии *M.tuberculosis* H₃₇Rv, *M.bovis* 8, *M.fortuitum* 342. Тест-объекты помещали в стерильные чашки Петри с перегородками.

После высыхания взвеси тест-объекты смачивали 0,3 мл стерильной дистиллированной воды и наносили по 10 мг на 1 см² Любисан Эко. На контрольные тест-объекты наносили стерильный тальк. В последующем тест-объекты каждые сутки увлажняли стерильной дистиллированной водой.

Исследования провели на 1, 3, 6, 10 сутки экспозиции (через 7 суток обработка проводилась повторно из расчета 10 мг на 1 см²).

В указанные выше сроки с каждого тест-объекта делали смыв стерильным 0,15М хлоридом натрия с 0,02% твина 80 (по 1 мл). Полученную суспензию центрифугировали при 600 об/мин для удаления крупных частиц и при 14 000 об/мин для осаждения микобактерий. Надосадочную жидкость удаляли, осадок суспендировали на вортексе в 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. 3 мл используем для посева на 10 пробирок среды Левенштейна-Йенсена (по 0,3 мл). По 1 мл смывов *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv и *M.bovis* 8, полученных после 10 суточного инкубирования, подкожно ввели 4 морским свинкам (смывом с контрольного тест-объекта заразили 2 морских свинки).

Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии определим по результатам посева (сравнение числа колоний выросших в опыте и в контроле) и результатам убоя морских свинок через 2 месяца после заражения.

Для решения 2 задачи приготовили тест-объекты (по 3 на каждый вид микобактерий) из фрагментов кирпича (1x2 см), которые предварительно стерилизовали при 121⁰С в течение 30 мин. На смоченные стерильной дистиллированной водой тест-объекты нанесли Любисан Эко из расчета 10 мг на 1 см², а на контрольные тест-объекты - стерильный тальк.

На слой дезинфектанта и на контрольные тест-объекты нанесли по 0,5 мл суспензии *M.tuberculosis* H₃₇Rv, *M.bovis* 8, *M.fortuitum* 342. Тест-объекты помещали в стерильные чашки Петри с перегородками. После высыхания взвеси тест-объекты смачивали 0,3 мл стерильной дистиллированной воды.

Исследования провели на 1, 3, 6, 10 сутки экспозиции (через 7 суток обработка проводилась повторно из расчета 10 мг на 1 см²).

В указанные выше сроки с каждого тест-объекта делали смыв стерильным 0,15М хлоридом натрия с 0,02% твина 80 (по 1 мл). Полученную суспензию центрифугировали при 600 об/мин для удаления крупных частиц и при 14 000 об/мин для осаждения микобактерий. Надосадочную жидкость удаляли, осадок суспендировали на вортексе в 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. 3 мл используем для посева на 10 пробирок среды Левенштейна-Йенсена (по 0,3 мл). По 1 мл смывов *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M.bovis* 8, полученных после 10 суточного инкубирования, под-

кожно ввели 4 морским свинкам (смывом с контрольного тест объекта заразили 2 морских свинки).

Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии определяли по результатам посева, сравнивая число колоний (КОЕ) выросших в опыте и в контроле, а также результатам убоя морских свинок через 2 месяца после заражения.

Результаты исследований

Установлено, что Любисан Эко при экспозиции 1 сутки (табл.1) оказал выраженное влияние на все испытанные виды микобактерий и инактивировал 96,4% микробной популяции (*M.bovis* - 92,6%, *M.tuberculosis* - 97,9%, *M.fortuitum* - 98,8%).

Таблица 1- Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии разных видов при экспозиции 1 сутки (КОЕ- число колониеобразующих единиц)

Группы	Среднеарифметическое число КОЕ при экспозиции 1 сутки	Среднеарифметическое число КОЕ в контроле	% инактивации
1. <i>M.bovis</i> +Любисан-Эко	15	300	95%
2. Любисан-Эко+ <i>M.bovis</i>	29	300	90,3%
М=	22	300	92,6%
1. <i>M.tuberculosis</i> +Любисан-Эко	7	280	97,5%
2. Любисан-Эко+ <i>M.tuberculosis</i>	5	280	98,2%
М=	6	280	97,9%
1. <i>M.fortuitum</i> +Любисан-Эко	4,9	500	99%
2. Любисан-Эко+ <i>M.fortuitum</i>	7,2	500	98,6%
М=			98,8%

При экспозиции 3 суток (табл.2) Любисан Эко инактивировал 96,9% микробной популяции (*M.bovis* - 93,2%, *M.tuberculosis* - 98,3%, *M.fortuitum* - 99,2%).

При экспозиции 6 суток (табл.3) Любисан Эко инактивировал 98,6% микробной популяции (*M.bovis* - 98,1%, *M.tuberculosis* - 98,4%, *M.fortuitum* - 99,2%).

Таблица 2- Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии разных видов при экспозиции 3 суток (КОЕ- число колониеобразующих единиц)

Группы	Среднеарифметическое число КОЕ при экспозиции 1 сутки	Среднеарифметическое число КОЕ в контроле	% инактивации
1. <i>M.bovis</i> +Любисан-Эко	4,3	129	96,4%
2. Любисан-Эко+ <i>M.bovis</i>	13	129	90%
М=	8,7	129	93,2%
1. <i>M.tuberculosis</i> +Любисан-Эко	3	147	98%
2. Любисан-Эко+ <i>M.tuberculosis</i>	2	147	98,6%
М=	2,5	147	98,3%
1. <i>M.fortuitum</i> +Любисан-Эко	4,6	290	98,4%
2. Любисан-Эко+ <i>M.fortuitum</i>	0	290	100%
М=	2,3	290	99,2%

Таблица 3- Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии разных видов при экспозиции 6 суток (КОЕ- число колониеобразующих единиц)

Группы	Среднеарифметическое число КОЕ при экспозиции 1 сутки	Среднеарифметическое число КОЕ в контроле	% инактивации
1. <i>M.bovis</i> +Любисан-Эко	1,5	59	97,5%
2. Любисан-Эко+ <i>M.bovis</i>	0,75	59	98,7%
М=	1,1	59	98,1%
1. <i>M.tuberculosis</i> +Любисан-Эко	1	63	98,4%
2. Любисан-Эко+ <i>M.tuberculosis</i>	1	63	98,4%
М=	1	63	98,4%
1. <i>M.fortuitum</i> +Любисан-Эко	4,6	200	97,7%

2. Любисан-Эко+ <i>M. fortuitum</i>	0	200	100%
М=	2,3	200	99,2%

Повторная обработка инфицированных тест-объектов Любисаном Эко полностью инактивировала микобактерии (табл.4).

Таблица 4- Эффективность действия Любисана Эко на микобактерии разных видов через 3 суток после повторной обработки (КОЕ- число колониеобразующих единиц)

Группы	Среднеарифметическое число КОЕ при экспозиции 1 сутки	Среднеарифметическое число КОЕ в контроле	% инактивации
1. <i>M. bovis</i> +Любисан-Эко + повторная обработка Любисаном-Эко	0	42	100%
2. Любисан-Эко+ <i>M. bovis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	0	42	100%
М=	0	42	100%
1. <i>M. tuberculosis</i> +Любисан-Эко+ повторная обработка Любисаном-Эко	0	51	100%
2. Любисан-Эко+ <i>M. tuberculosis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	0	51	100%
М=	0	51	100%
1. <i>M. fortuitum</i> +Любисан-Эко + повторная обработка Любисаном-Эко	0	127	100%
2. Любисан-Эко+ <i>M. fortuitum</i> +повторная обработка Любисаном-Эко	0	127	100%
М=	0	127	100%

Существенных различий в эффективности при нанесении препарата на инфицированный объект или его действия на возбудитель при нахождении на тест-объекте не отмечено, хотя прослеживалась тенденция более выраженного действия, когда микобактерии попадали на слой препарата.

При заражении морских свинок установлено, что в группах, которым вводили микобактерии туберкулеза, контактировавшие с Любисаном Эко, потери живой массы не установлено, в то время как в контроле перед этаназией отмечалось 6,8-7,1% снижение (табл.5). Это свидетельствовало о том, что микобактерии туберкулеза, контактировавшие с Любисаном Эко не вызывали заболевания животных. Это подтвердили результаты вскрытия животных (табл.6). Если у морских свинок, зараженных микобактериями туберкулеза, контактировавшими с препаратом отмечались лишь локальные изменения в месте инъекции (рис. 1), то у контрольных животных отмечено развитие во внутренних органах специфических туберкулезных узелков.

Таблица 5- Живая масса морских свинок после заражения

Группа животных	Масса перед заражением	Масса через 1 месяц	Масса перед этаназией
<i>M.bovis</i> +Любисан-Эко + повторная обработка Любисаном-Эко	670	678 (+1,2%)	701 (+4,6%)
2. Любисан-Эко+ <i>M.bovis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	683	697 (+2,0%)	710 (+4,0%)
Контроль	675	667 (-1,2%)	629 (-6,8%)
1. <i>M.tuberculosis</i> +Любисан-Эко+ повторная обработка Любисаном-Эко	678	691 (1,9%)	703 (3,6%)
2. Любисан-Эко+ <i>M.tuberculosis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	690	702 (+1,7%)	711 (+3,0%)
Контроль	688	667 (-3%)	639 (-7,1%)

Таблица 6- Результаты аутопсии зараженных морских свинок

Группа животных	Патологические изменения на вскрытии
<i>M.bovis</i> +Любисан-Эко + повторная обработка Любисаном-Эко	Узелок (3x4 мм) в месте инъекции с незначительным увеличением регионарного пахового лимфатического узла. Внутренние органы без видимых изменений
2. Любисан-Эко+ <i>M.bovis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	Узелок (3x4 мм) в месте инъекции с незначительным увеличением регионарного пахового лимфатического узла. Внутренние органы без видимых изменений
Контроль	Гранулематозное воспаление в месте инъекции, лимфаденит паховых лимфатических узлов, увеличение селезенки, светлые узелки

	диаметром около 1-1,5 мм в печени
1. <i>M.tuberculosis</i> + Любисан-Эко+ повторная обработка Любисаном-Эко	Узелок (3x4 мм) в месте инъекции с незначительным увеличением регионарного пахового лимфатического узла. Внутренние органы без видимых изменений
2. Любисан-Эко+ <i>M.tuberculosis</i> + повторная обработка Любисаном-Эко	Узелок (3x4 мм) в месте инъекции с незначительным увеличением регионарного пахового лимфатического узла. Внутренние органы без видимых изменений
Контроль	Гранулематозное воспаление в месте инъекции, лимфаденит паховых лимфатических узлов, увеличение селезенки, светлые узелки диаметром около 1-1,5 мм в печени



Рис. 1 Место инъекции у морской свинки, зараженной *M.bovis*, обработанным Любисаном Эко.

Выводы

1. Любисан Эко при нанесении на инфицированные тест-объекты в рекомендуемой для применения в животноводческих помещениях дозе -10 мг/см^2 , оказывает выраженное инактивирующее действие на микобактерии туберкулеза и атипичные микобактерии, проявляющееся в гибели 90,3-100% популяции.
2. Двухкратная обработка инфицированных тест-объектов с интервалом в 6-7 суток приводит к полной инаktivации микобактериальной популяции и потере ее вирулентности.
3. Любисан Эко может быть рекомендован для профилактики туберкулеза животных и для проведения мероприятий по обеззараживанию внешней среды путем нанесения на поверхности животноводческих помещений из расчета 100 г/ м^2 (в присутствии животных) с интервалом в 6-7 суток.

Заведующий отделом зоонозов и разработки диагностических препаратов профессор, доктор ветеринарных наук

А.П. Лысенко